367—373

283(15)

动 物 学 研 究 14 (4): 367—373
Zoological Research

ISSN 0254-5853
CN 53-1040 / Q

草鱼染色体的包装（间期—中期）

杭 绮 毛树坚
(杭州大学生物研究所 310012)

Q959.468

A

摘要 以草鱼 ZC 7901 细胞株为材料，观察鱼类细胞从间期染色质到中期染色体的包装过程。主要通过：(1) 分裂期与间期细胞融合，诱导染色体早熟凝集；(2) 染色体"伸长"处理；(3) 培养细胞的低渗处理；(4) 染色质铺展等方法，制作染色体标本，进行扫描和透射电镜观察。

观察表明，鱼类染色质的基本结构与哺乳类细胞相同，也是直径约 10 nm 的核丝(Nucleofilament)。染色体的色装有两种形式：一种是多级螺旋化形成直径约 300 nm 的染色单体，再经过一次绞合，形成约 600 nm 的染色体；另一种是从 30 nm 或 60 nm 的螺线管直接折叠交联包装，其间也伴有部分不规则螺旋的纤丝形成染色体。本文认为：前一种螺旋化是草鱼染色体的正常包装，后一种折叠交联是染色体的快速早熟包装。

关键词：草鱼，染色体包装，早熟凝集染色体

鱼纲

真核细胞染色体的包装有 3 种基本模型：四级螺旋模型(Bak 等，1977)；不规则纤维折叠模型(Dupraw，1965)及骨架辐射环纤维模型(Laemmli 等，1970；Adolph 等，1980)。近年来，也有人提出折叠直线和辐射环并存(Mullinger 等，1980)及辐射环与螺线管并存等模型(Ratter 等，1985)。

鱼类细胞的染色体很小，是染色体工作的难点。近年国内外关于鱼类染色体较多的是有关制备方法、带型和核型等的研究(Gold 等，1991；Klinkhardt 等，1991；Fan 等，1990；刘凌云，1983)，超微结构方面虽有报道(赵晞，1987；费青等，1988)，但有关鱼类染色体的包装过程，至今仍然是一个未解决的问题。本文通过多种染色体技术，对草鱼染色体的包装进行了观察。

材 料 和 方 法

培养细胞 草鱼(*Ctenopharyngodon idellus* C. *et* V.)吻端组织 ZC-7901 细胞株，用含 10%小牛血清的 M-199 培养液，26℃常规方法培养。

诱导产生早熟凝集染色体(PCC) 用 PEG 诱导细胞融合，从分裂期与间期(M—I)融合细胞中获得 G_1、S、G_2 各期 PCC(杭绮等，1992)。

本文 1992 年 10 月 9 日收到，1993 年 3 月 22 日修回。

染色体"伸长"的处理 依刘凌云(1988)方法稍加改变。选生长良好的培养细胞，经BrdU和秋水仙素及放线菌素D(AMD)处理后收集细胞，再经低渗处理及固定后，一部分细胞制成光镜标本，一部分制备电镜标本。

扫描电镜标本的制备 PCC和经染色体伸长处理的材料，经Carnoy液固定，滴于预先喷镀铂膜的盖玻片上，戊二醛-锇酸双固定后，以单宁酸-锇酸法进行组织导电处理。样品在临界点干燥后经离子溅射喷铂膜。日立S-520扫描电镜观察。部分样品在戊二醛-锇酸双固定前经DNaseⅡ处理15 min。

透射电镜标本的制备 上述PCC及染色体伸长处理的材料，按常规方法制备超薄切片。部分正常培养细胞经秋水仙素及NaCl低渗液处理后制片。H-600电镜观察。

染色质的铺展标本 按赵晞(1987)方法稍加改变。培养细胞以秋水仙素处理后经$MgCl_2$低渗液处理，使细胞破裂，镜检见大部分核游离后，离心出细胞核，先略触双蒸水表面，使核胀破，再将样品置离心管中通过一层介质直接离心至铜网上。取出铜网，用Photoflo清洗，醋酸铀染色，双蒸水洗后干燥，H-600电镜观察。

结 果

间期核的染色质 在间期细胞的铺展标本中，核染色质大多松开并铺展为直径约10 nm的纤丝，但也有些纤丝没有完全松开，仍螺旋成松紧不一的螺线管，螺幅有30 nm和60 nm两类(图版Ⅰ：1，2)。在经过BrdU，低渗等处理过的间期细胞超薄切片中也观察到直径25—30 nm和60—70 nm两类粗细不一的染色质纤丝(图版Ⅰ：3)，与铺展标本中所见结果一致。

前期染色体的包装 在PEG诱导的M—I融合细胞中，扫描电镜下看到间期细胞核的染色质纤丝(30 nm和60 nm螺线管)互相交织成网状结构，网格很密(图版Ⅱ：9)。在PCC凝集开始时，纤丝在不大幅度位移的情况下螺旋成螺幅约150 nm的粗丝。此时网状结构依然存在，但纤丝变粗，网格变疏(图版Ⅰ：4，5)。在许多PCC细胞中，凝集时大多数30 nm和60 nm纤丝不进一步螺旋化，而是经过大幅度的位移纵横折叠，形成一堆堆前期染色体的雏型，各前期染色体间有纤丝互相联结。整个核的染色质由原来完整的网状结构变成破网状结构。但在这些折叠形成的前期染色体中，仍然有部分30 nm和60 nm纤丝螺旋成粗细不一的粗丝，螺旋很不规则，有的还螺旋扭曲成结节(图版Ⅱ：10，11)。

早中期染色体的包装 继前期的凝集以后，仍然是两类包装形式：一类由150 nm的粗丝大幅度的位移，进一步螺旋化，形成螺幅约300 nm的染色单体。两条染色单体形成以后紧密靠拢，互相绞合(图版Ⅰ：6，7)。另一类包装，是从前期染色体进一步紧密折叠，凝集成一条条明显的早中期染色体。如前期的折叠交联包装一样，早中期染色体中也伴有部分粗细不等的、不规则的螺旋化的粗丝(图版Ⅱ：11，13)。在DNaseⅡ轻度处理的标本中，折叠交联包装中的纵横纤丝更加清晰(图版Ⅱ：12)。

中期染色体的包装 中期染色体的直径约500—600 nm，是早中期染色体进一步螺旋或折叠交联所形成的(图版Ⅰ：7，8；图版Ⅱ：13，14)。由于包装比早中期染色体

紧密得多，因而内部结构不易看清。在超薄切片中中期染色体直径约 500 nm，电子密度大，着色深，说明内部包装紧密；而早中期染色体着色浅，内部结构较疏松(图版Ⅱ：15，16)，与扫描电镜观察到的结果相符合。

讨　　论

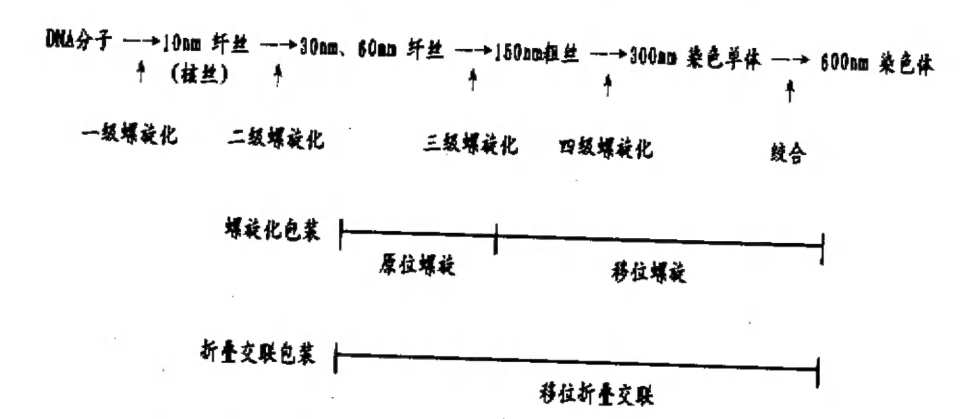
草鱼细胞间期核的染色质　Olins(1974)等早已证实真核细胞染色质的基本结构是核小体构成的直径约 10 nm 的核丝(Nucleofilament)。在草鱼间期细胞染色质的铺展标本中可以看到这种核丝，说明鱼类细胞的染色质基本结构与其它真核细胞相同。在标本中也常看到一些未解开的 30 nm 和 60 nm 螺线管，表明核丝在铺展前处于螺线管结构。

在经过低渗处理后的固定的间期核中，染色质是由 30 nm 和 60 nm 纤丝构成的网状结构。这与在人淋巴细胞中观察到的染色质结构一致(Golomb 等，1974)。表明由螺线管构成的网状结构是间期核染色质的基本形态。

草鱼细胞染色体的包装　(1) 四级螺旋包装：Bak 等(1977)的螺旋模型是将从 2—3 nm 的 DNA 分子包装成 10 nm 的核丝称为一级螺旋化，10 nm 的核丝包装成 30 nm 的螺线管称为二级螺旋化。本文观察到草鱼染色质的二级螺旋化稍有不同：草鱼的核丝由于螺旋的松紧不一，构成 30 nm 和 60 nm 两类螺线管，螺旋松的是 30 nm，紧的是 60 nm(图版Ⅰ：1，2)。细胞的染色质出现凝集后，螺线管螺旋成 150 nm 粗丝，就是三级螺旋化。二级、三级螺旋化时，螺线管在不大幅度移动下进行螺旋，因而整个染色质的网状结构依然存在，我们称这种现象为“原位螺旋”(或“原位凝集”)。150 nm 粗丝螺旋成 300 nm 的染色单体时，粗丝大幅度位移，网状结构失去，可以称为“移位螺旋”(或“移位凝集”)，这是四级螺旋化。两条染色单体在螺旋完成后，互相绞合。这个绞合过程不很长，因为到了正中期以后，染色单体又分开。这种绞合在生物学上有什么作用?姐妹染色单体间的交换(SCE)是否就在此过程中发生？有待进一步研究。

(2) 折叠交联包装：通过折叠交联形成的染色体，有的可以看到两条染色单体，这无疑是 G_2 期 PCC，有的只有单一的染色体结构，显然是 G_1 期 PCC，因为 G_1 期 DNA 尚未复制。有人在人外周淋巴细胞中观察到类似的折叠包装，他们将包装中直线折叠的螺线管称作纵行纤维(Longitudinal fibre)；将螺旋的粗丝作弯环纤维(Tortuous looping fibre)，因为螺旋得宽松的粗丝看起来很象是弯曲的环状结构；将由螺旋而扭曲堆积的结节称作染色粒(Chromomere)(Golomb 等，1974)。虽然名称不同，实质上却是相近的。Golomb 等还用 DNaseⅡ处理人淋巴细胞染色体标本，结果使染色粒的排列更为明显可辨，他认为虽然 DNaseⅡ对染色体的酶解处理，虽然机制不很清楚，但可以利用这个方法分析人类染色粒的变异。我们用 DNaseⅡ轻度处理草鱼细胞早中期染色体，结果使染色体包装中的折叠交联纤维网状结构更加清晰。

两类包装过程可以归纳示意如下页图：



草鱼染色体包装模型的探讨 观察表明，草鱼染色体的包装与Bak等的四级螺旋模型和Duprow等的不规则折叠纤维模型相近(见图1)。费青等(1988)对黄鳝肾细胞和鲫鱼血淋巴细胞的染色体进行电镜观察，看见直径约为30 nm的染色质纤维扭曲螺旋缠绕，类似"辐射环"的结构。我们采用了多种使染色体结构宽松的技术，均未在草鱼染色体中看到有辐射环结构。比较螺旋化与折叠交联两种包装，主要是后者缺少前者的"原位螺旋"和一系列正常的螺旋状。

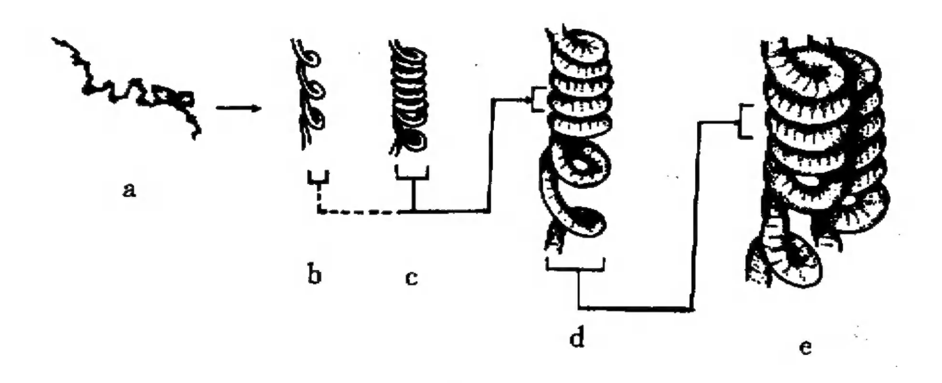


图1 染色体螺旋化包装示意图

Fig. 1 Illustration of spiralization in chromosome packing of Grass Carp

a. 染色质的基本结构核丝(10 nm) b. 由核丝螺旋化形成的30 nm螺线管

c. 由核丝螺旋化形成的60 nm螺线管 d. 由螺线管螺旋化形成的150 nm粗丝

e. 由150 nm粗丝螺旋化形成的染色单体，两条染色单体紧密并列，构成染色体

从草鱼的PCC和经过BrdU等处理后的标本看到多数是折叠交联的包装。这些染色体标本与折叠交联包装之间有什么必然的关系？正常的哺乳类细胞在DNA复制后通常需要有2—4 h的成熟过程，为再次有丝分裂作准备。如果在间期中这一成熟过程受阻断，将引起染色体畸变或出现不完全凝集(Sperling等，1974)。在上述PCC的包装

中，30 nm 和 60 nm 螺线管不进行原位螺旋而直接折叠交联，推测就是由于间期细胞在与分裂期细胞融合的条件下，提前凝集，失去正常细胞的成熟过程所致。因此，可以把折叠交联包装看作是跃过螺旋化步骤的一种快速的早熟包装。至于在折叠交联包装中为什么伴有一部分螺旋化的粗丝？这是由于细胞基因组的 DNA 复制有早晚。复制早的，可以接近完成成熟过程，因而出现部分纤丝不很规则的螺旋化；复制晚的来不及完成成熟过程，只能不经过螺旋化而直接折叠交联。用 BrdU 替代 TdR 掺入 DNA，可以造成类似 PCC 的"螺旋化延迟"(Spiralization delay)现象(周洁民等，1983)，使染色体不能紧密螺旋而"伸长"，因而在包装中也出现类似于 PCC 的那种早熟包装。

折叠交联包装在细胞正常发育中有什么意义?在正常的细胞周期中，不同染色体上 DNA 的复制和同一染色体上不同部位的 DNA 复制都有一定的时间顺序(Mariani 等，1984)，DNA 的复制和染色体的凝聚都有相对自主的过程(Drouin，1991)。在 DNA 复制有早有晚不同步的情况下，先完成复制的染色体可以进行螺旋化包装，而后完成复制的，必须以一种快速的形式进行包装，才能使同一分裂相中的许多染色体同步地完成包装和细胞分裂。因此，一种快速的折叠交联包装作为螺旋化包装的补充，是正常的细胞发育所需要的。

致谢：本工作在电镜观察方面承浙江丝绸科学研究院蒋宝永和国家第二海洋研究所章敏同志协助，本所郁昭愈、陈汉民同志也惠予大力支持，谨致谢忱。

图 版 说 明

图版 I：

1. 铺展的染色质纤丝，小箭头示 10 nm 纤丝(核丝)；大箭头示未展开的 30 nm 螺线管。×70K
2. 箭头示螺旋着的 60 nm 螺线管。×50K
3. 低渗处理后间期细胞核切片，小箭头示 25—30 nm 纤丝；大箭头示 60—70 nm 纤丝。×15K
4. 染色体的螺旋化包装(前期)，箭头示正在螺旋化的 150 nm 粗丝。×10K
5. 前期→早中期，小箭头示 150 nm 粗丝；大箭头示已形成的 300 nm 染色单体。×15K
6. 早中期→中期，小箭头示两条150 nm粗丝正在螺旋成染色单体；大箭头示染色体的一端已包装完成。×20K

7—8. 中期，箭头示螺旋中的 150 nm 粗丝。×20K，×10K

图版 II：

9. M—I融合细胞，A是M期染色体，B是I期细胞中由染色质的基本纤丝(30 nm，600 nm)构成的网状结构。×3.0K
10. 染色体的折叠交联包装(前期)，染色质纤丝移位折叠，伴有不规则的螺旋化纤丝。×10K
11. 前期→早中期，箭头处两条染色单体正在形成。×10K
12. 早中期，经 DNaseII 轻度处理，折叠中的网状结构更清晰。×12K
13. 早中期，染色单体明显。×12K
14. 中期，3条染色体不同步包装，小箭头示基本完成包装的染色体；大箭头示尚在紧密折叠的染色体。

×12K

15. 超薄切片中的中期染色体，结构紧密。×15K

16. 早中期染色体，结构较疏松。×20K

注：透射电镜用 H-600 电镜，扫描电镜用 S-520 电镜。

参 考 文 献

刘凌云. 1983. 黄鳝染色体 G 带带型的研究. 遗传学报, **10**: 230—234.

杭 绮, 毛树坚. 1992. 草鱼细胞早熟染色体凝聚的光镜和电镜的研究. 生命科学论文集, 杭州大学出版社. 120—124.

周措民, 王顺德, 项 维. 1983. 染色体显带和姐妹染色单体"色差"的电镜研究. 实验生物学报, **14**: 101—105.

费 青, 刘凌云. 1988. 几种动物染色体超微结构的研究. 遗传学报, **15**(5): 362—367.

赵晞. 1987. 银鲫成熟精子染色质的结构和碱性蛋白的研究. 实验生物学报, **20**: 150—169.

Bak A L, J Zeuthen *et al.* 1977. Higher-order structure of human mitotic chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **74**: 1595-1599.

Dupraw E J. 1965. Macromolecular organization of nuclei and chromosome: a folded fibre model based on wholemount electron microscope. *Nature*, **206**: 338-343.

Drouin R, N Lemieux, C L Richer. 1991. Chromosome condensation from prophase to late metaphase: Relationship to chromosome bands and their replication time. *Cytogenet Cell Genet*, **57**(2/3): 91-99.

Fan Z, D P Fox. 1990. A new method for fish chromosome preparation. *J. Fish. Biol.*, **37**(4): 553-562.

Gold J R, Y C CI. 1991. Trypsin G-banding of North American Cyprinid chromosome: Phylogenetic considerations, implications for fish chromosome structure and chromosomal polymorphism. *Cytologia* (Tokyo), **56**(2): 199-208.

Klinkhardt, Manfred B. 1991. A brief comparison of methods for preparing fish chromosomes: An overview. *Cytibios*, **67**(270/271): 193-208.

Laemmli U K, S M Cheng, K W Adolph *et al.* 1970. Metaphase chromosome structure: The role of non-histone proteins. Cold Spring Harbor Symp. *Quant. Biol.*, **42**: 109-118.

Mariani B D, R T Schimke. 1984. Gene amplication in a single cell cycle in Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.*, **259**: 1901-1910.

Mullinger A M, R T Johnson. 1980. Packing DNA into chromosomes. *J. Cell. Sci.*, **46**: 61-68.

Olins A L, D E Olins. 1974. Spheroid chromatin units (v bodies). *Science*, **183**: 330-332.

Ratter J B, C C Lin. 1985. Radial loops and helical coils coexist in metaphasre chromosomes. *Cell*, **42**: 291-296.

Sperling K, P N Rao. 1974. The phenomenon of premature chromosome condensation: Its relevance to basic and applied research. *Humangenetic*, **23**: 235-258.

Taniquchi T, S Takayama. 1986. High-order structure of metaphase chromosome: Evidence for a multiple coiling model. *Chromosoma* (Berl.), **93**: 511-514.

CHROMOSOME PACKING OF THE GRASS CARP (*Ctenopharyngodon idellus*) FROM INTERPHASE TO METAPHASE

Hang Qi Mao Shujian

(*Biological Research Institute, Hangzhou University* 310012)

The cell strain ZC—7901 of Grass Carp snout tissue was adopted for the research of packing from basic chromatin fibres to chromosomes. In studying of the subject, four methods were used: the induction of premature chromosome condensation in interphase nuclei by fusing with metaphase cell; the "elongation" of chromosomes; the moderate hypo—osmosis of culture cells and spreading chromatin. Scanning and transmission electron microscopes were used to investigate the prepared specimens.

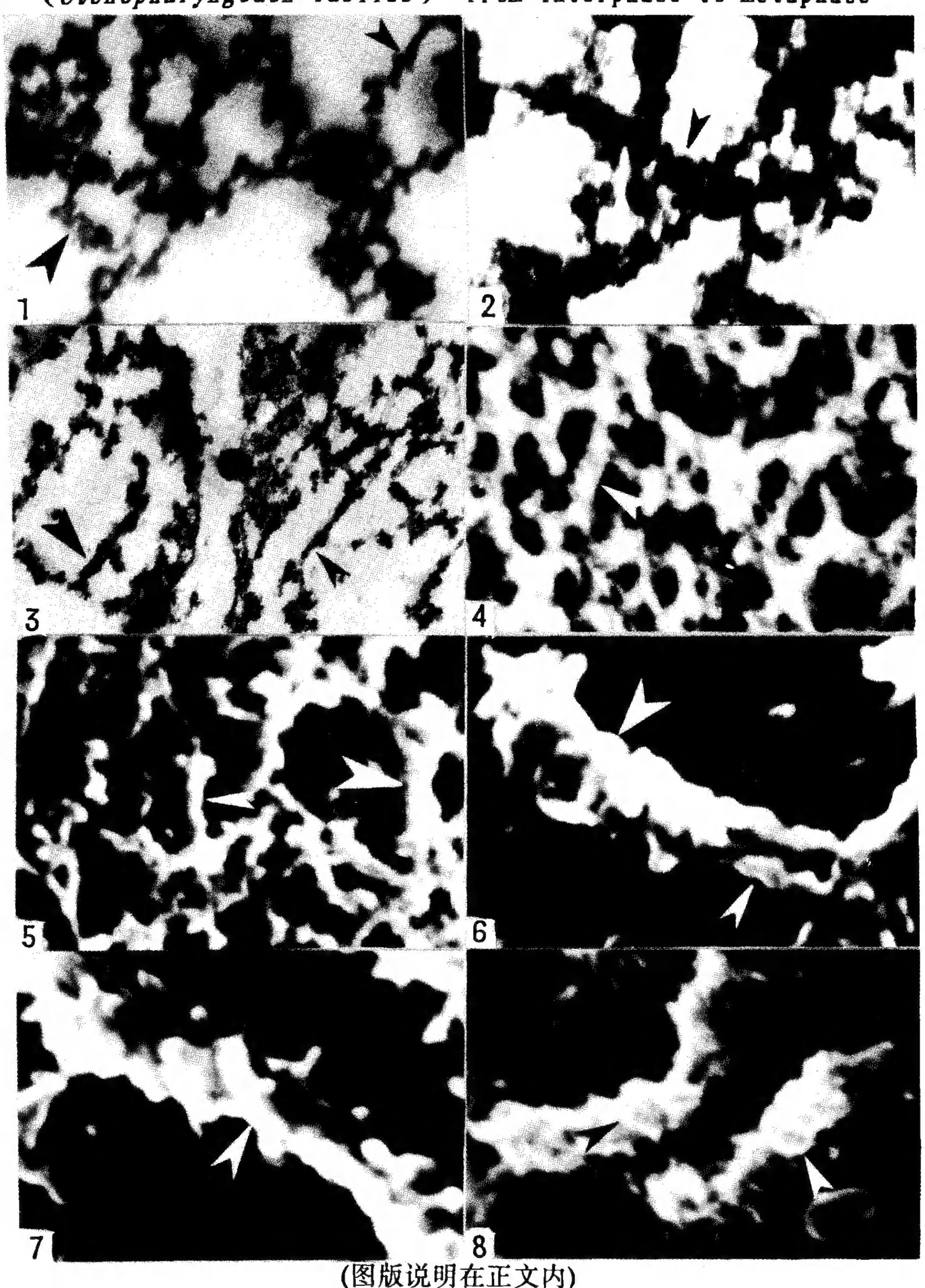
The observations showed that the basic structure of fish chromatin was the same as that of mammalians, which was the nucleofilament of 10 nm in diameter. There were two patterns from the chromatin packing into the chromosome: one was the multiple spiralization from the basic fibre into the chromatid of about 300 nm in diameter, and then to the sister chromatids which twisted into the chromosome; the other one was the directly fold coupling from 30 nm or 60 nm solenoids into the chromosome in which the partial helical irregular fibres coexisted.

It was suggested that the spiralization was the normal packing pattern of the chromosomes of Grass Carp, and the fold coupling was the rapid and premature condensation.

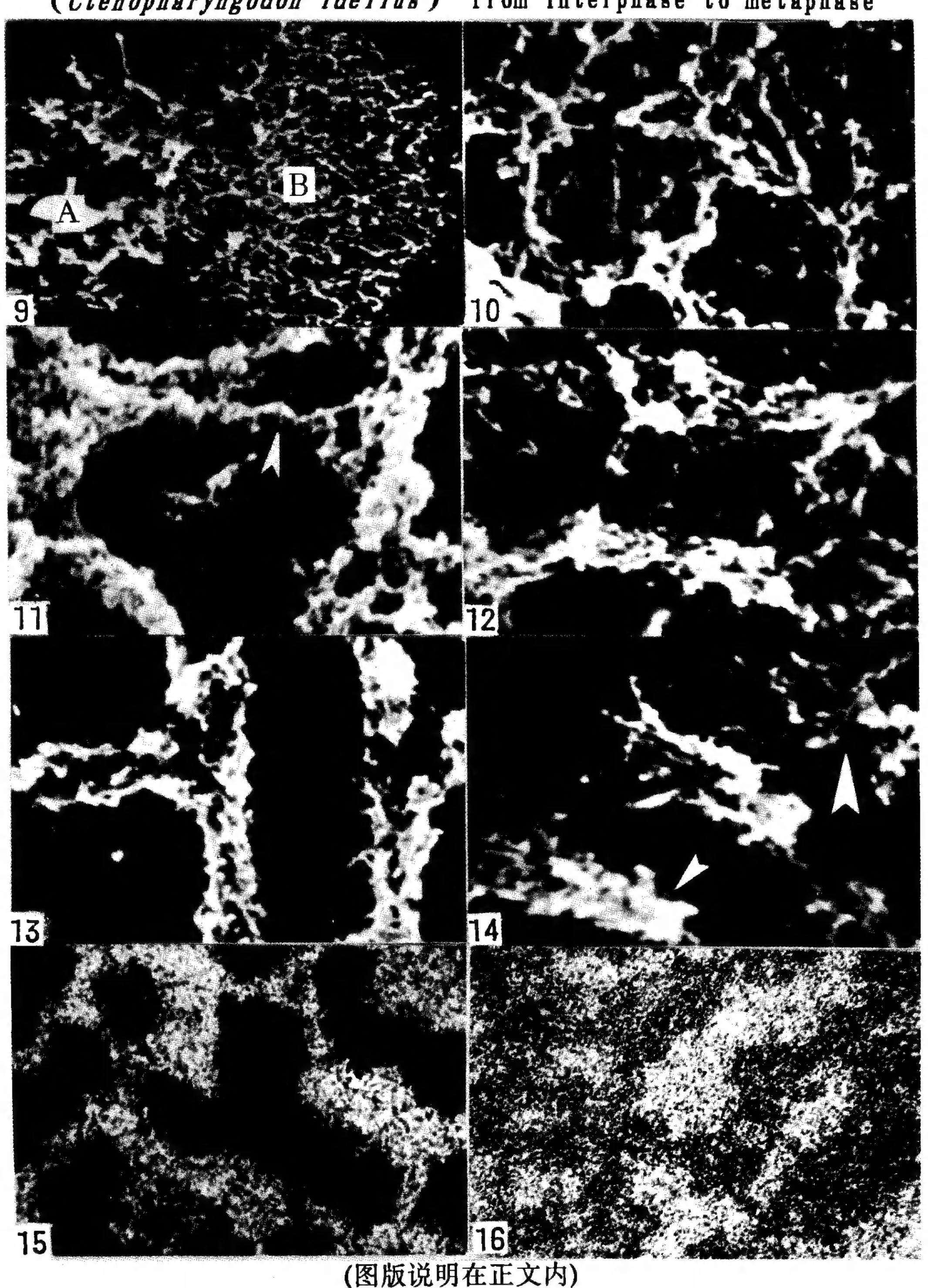
Key words: Grass Carp, Chromosome packing, Premature chromosome condensation

杭绮等：草鱼染色体的包装（间期—中期） 图版 I

Hang Qi *et al.*: Packing of chromosomes of the Grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) from interphase to metaphase



(图版说明在正文内)



(图版说明在正文内)